

Publ. FR 2 004 / 0000073
- 5 MARS 2004

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 JAN. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 0 H / 211

REMISE DES PIÈCES

DATE **15 JAN 2003**

LIEU **75 INPI PARIS B**

N° D'ENREGISTREMENT

0300422

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

15 JAN. 2003

PAR L'INPI

Vos références pour ce dossier

(facultatif) LV/LN - BFF010330

☒ NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET PLASSERAUD
84 rue d'Amsterdam
75440 PARIS CEDEX 09

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

☒ NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de
brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

☒ TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PROTEINE DE FUSION INDUCTRICE DE L'EXPRESSION D'UN GENE ET PROCEDE DE CONTROLE DE
L'INDUCTION DE L'EXPRESSION D'UN GENE

☒ DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

☒ DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale

☐ Personne physique

Nom

ou dénomination sociale

MILLEGEN

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

4 2 4 7 1 6 0 1 7

Domicile

ou

siège

Rue

10, avenue de l'Europe

Code postal et ville

3 1 5 2 5 RAMONVILLE St.AGNE

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PIÈCES
DATE **15 JAN 2003**
LIEU **75 INPI PARIS B**
N° D'ENREGISTREMENT **0300422**
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Réservé à l'INPI

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet PLASSERAUD
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	84, rue d'Amsterdam
	Code postal et ville	75 14 14 10 PARIS CEDEX 09
	Pays	France
N° de téléphone (facultatif)		01.44.63.41.11
N° de télécopie (facultatif)		01.42.80.01.59
Adresse électronique (facultatif)		info@plass.com
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG [] [] [] [] [] []
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Laurence VERCAEMER CPI 00-0410		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE **15 JAN 2003**

LIEU **75 INPI PARIS B**

N° D'ENREGISTREMENT

0300422

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 @ W / 010702

Vos références pour ce dossier (facultatif)

LV/LN - BFF010330

☒ **DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☒ **DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)**

☒ **Personne morale**

☐ **Personne physique**

Nom

ou dénomination sociale

INSERM

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile

ou

siège

Rue

101, rue de Tolbiac

Code postal et ville

17 15 16 15 14 PARIS Cédex 13

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ **DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)**

☒ **Personne morale**

☐ **Personne physique**

Nom

ou dénomination sociale

UNIVERSITÉ PAUL SABATIER

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile

ou

siège

Rue

118 route de Narbonne

Code postal et ville

31 06 12 TOULOUSE

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ **SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)**

Laurence VERCAEMER
CPI 00-0410

**VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI**

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

PROTEINE DE FUSION INDUCTRICE DE L'EXPRESSION D'UN GENE
ET PROCEDE DE CONTROLE DE L'INDUCTION DE L'EXPRESSION
D'UN GENE

5 L'invention a pour objet un procédé de contrôle de l'induction de l'expression d'un gène, et en particulier un procédé de contrôle de l'induction de la traduction d'un gène.

10 Dans le domaine du traitement de maladies héréditaires ou génétiques, des traitements de type thérapie génique, permettant de remplacer ou corriger des gènes défectueux sont en cours de développement. La thérapie génique peut également avoir des applications importantes dans la délivrance de protéines, telles que
15 par exemple des cytokines, des antioncogènes, des hormones ou des anticorps, lesdites protéines ayant une activité thérapeutique dans le traitement de pathologies de type cancer ou infections virales.

Cependant, même si l'on peut induire l'expression
20 d'un gène, donc de la protéine codée par le gène, l'absence de moyens de contrôle de l'expression de cette protéine est une barrière à l'utilisation de telles techniques, en particulier dans le cadre d'une thérapie génique. Un moyen simple et sûr de contrôle de
25 l'induction de l'expression d'un gène, et donc de la protéine qu'il code, trouverait des applications aussi bien dans des protocoles de thérapie génique, que dans l'établissement de lignées cellulaires exprimant un transgène ou encore dans l'obtention d'animaux
30 transgéniques.

On connaît déjà des moyens d'induction de l'expression d'un gène.

Cependant, la plupart des moyens décrits sont basés sur des inductions transcriptionnelles et présentent des inconvénients majeurs pour une utilisation en thérapie génique. On citera en particulier l'article de Mills (2001) *Changing colors in mice: an inducible system that delivers*, GENES & DEVELOPMENT, 15:1461-1467. Les protéines chimères activatrices de ces différents systèmes de l'art antérieur provoquent des réactions immunogéniques et/ou les inducteurs pharmacologiques utilisés (tétracycline, rapamycine) entraînent des réactions cellulaires et tissulaires non souhaitées.

Par ailleurs, la demande de brevet WO00/53779 décrit un procédé d'induction traductionnelle de l'expression d'un gène, utilisant une protéine de recrutement des ribosomes, c'est-à-dire une protéine analogue à eIF4G ou un dérivé ou fragment traductionnellement actif de celle-ci. Cette protéine est fusionnée avec une protéine ou un fragment ou dérivé de protéine, capable de se fixer sur un site de fixation de protéine hétérologue ou HBS (« heterologous protein-binding site ») présent sur l'ARNm. Un exemple de protéine se fixant à l'ARNm est l'IRP-1. Un exemple d'HBS est l'IRE (« Iron Responsive Element »). La protéine de fusion obtenue peut se fixer sur un HBS, et joue le rôle d'un activateur de la traduction de l'ARNm donc de l'expression de la ou des protéines codées par cet ARNm en aval de l'HBS.

Ce document explique également que l'expression de la ou des protéines peut être contrôlée. Ce contrôle est effectué par l'utilisation de différents HBS sur l'ARNm. Il s'agit donc d'un contrôle a priori, exercé

au début du traitement ou de l'expérience, plutôt que d'une réelle maîtrise de l'induction. Une fois le nombre et la nature des HBS choisis, l'induction de la traduction n'est plus modulable.

5 Par conséquent, il existe encore un besoin d'un moyen de contrôle modulable de l'induction de l'expression d'un gène, contrôle qui doit pouvoir s'exercer à tout moment au cours de la mise en œuvre de l'induction de l'expression, aussi bien qualitativement
10 que quantitativement.

La présente invention a donc pour objet un procédé de contrôle externe, permanent et modulable de l'induction de l'expression d'un gène, ledit contrôle permettant de déclencher, d'arrêter et de moduler
15 l'induction à tout moment. Par induction de l'expression, on entend induction de toute étape de l'expression d'un gène, c'est-à-dire notamment la traduction, la transcription, l'épissage des pré-ARNm, la polyadénylation des pré-ARNm, etc.

20 Dans le cadre de l'invention, l'induction de l'expression d'un gène est mise en œuvre par l'expression d'une protéine de fusion spécifique, appelée protéine de fusion inductrice.

La protéine de fusion inductrice mise en œuvre
25 pour induire l'expression d'un gène selon l'invention comprend d'une part un domaine peptidique de liaison aux acides nucléiques et un domaine activateur de l'expression dudit gène, et, d'autre part, un domaine permettant une délocalisation à la membrane
30 cytoplasmique. Le domaine permettant une délocalisation à la membrane cytoplasmique est un domaine de régulation post-traductionnel qui permet la

délocalisation de la protéine hors du cytoplasme, par un adressage cellulaire de cette protéine à la membrane plasmique, suite à la modification post-traductionnelle d'une cystéine, dans le domaine CAAX carboxy-terminal de la protéine d'intérêt à l'aide d'enzymes de type farnésyl-transférase ou géranylgéranyl-transférase. CAAX signifie "Cystéine-acide aminé Aliphatique-acide aminé X", où X peut être une méthionine, une glutamine, une sérine ou une thréonine.

10 Toute protéine ou polypeptide connu de l'homme du métier pour induire l'expression d'un gène peut être utilisé comme protéine de fusion inductrice selon l'invention, soit en tant que tel s'il comprend un domaine permettant une délocalisation vers les
15 membranes en plus du domaine activateur de l'expression du gène, soit en tant que protéine ou polypeptide de fusion en association avec un domaine activateur de l'expression du gène. En particulier, toute protéine de fusion connue de l'homme du métier pour induire la
20 traduction peut être utilisée, et notamment celles décrites dans la demande de brevet WO00/53779 mentionnée précédemment, à savoir toute protéine de fusion entre une protéine analogue à eIF4G ou à un dérivé ou fragment traductionnellement actif de celle-
25 ci, fusionnée avec une protéine ou un fragment ou dérivé de protéine se fixant à l'ARNm. On citera à titre non exhaustif la protéine de fusion entre eIF-4G1 et IRP-1.

La protéine de fusion inductrice selon
30 l'invention comprend donc un domaine permettant une délocalisation membranaire. Ce domaine est présent intrinsèquement ou est fusionné avec le domaine

peptidique de liaison aux acides nucléiques et le domaine activateur de l'expression.

Un domaine permettant une délocalisation membranaire est un domaine peptidique qui est le site
5 d'une modification post-traductionnelle de la protéine permettant la délocalisation aux membranes cellulaires (cytoplasmique, nucléaire, mitochondriale etc...) de la protéine comprenant ledit domaine. La modification post-traductionnelle peut être, à titre d'exemples non
10 limitatifs, une farnésylation, une géranylgéranylation, une myristilation, ou une palmytoylation, ou toute autre modification connue de l'homme du métier. Lorsqu'elle est munie de la séquence peptidique résultant de la modification post-traductionnelle, la
15 protéine est adressée à la membrane.

L'utilisation de la farnésylation a déjà été envisagée dans des traitements anti-cancéreux afin de rendre inactives certaines protéines (petites protéines G etc.) impliquées dans des pathologies, mais elle n'a
20 jamais été utilisée dans le cadre d'une induction de l'expression d'un gène.

Le procédé de contrôle de l'expression d'un gène selon l'invention comprend le contrôle externe permanent et modulable de l'induction de l'expression
25 du gène par modulation de l'état de modification post-traductionnelle de la protéine de fusion inductrice de l'expression du gène et plus particulièrement du domaine permettant une délocalisation membranaire. Ce
~~contrôle est mis en œuvre par l'utilisation d'un~~
30 ~~inhibiteur approprié de ladite modification post-traductionnelle.~~ Si la modification post-traductionnelle est une farnésylation, un inhibiteur

approprié est un inhibiteur de la farnésyl transférase, tel que FTI 277. Si la modification post-traductionnelle est une géranylgéranylation, un inhibiteur approprié est un inhibiteur de la géranyl transférase, tel que GGTI 298. L'homme du métier saura déterminer l'inhibiteur approprié compte tenu du domaine de modification post-traductionnelle présent.

En l'absence d'inhibiteur, la modification post-traductionnelle de la protéine de fusion inductrice aura lieu. La protéine de fusion, une fois synthétisée et munie de la séquence peptidique induisant la modification post-traductionnelle, sera ancrée dans une membrane cellulaire, et ne pourra donc jouer son rôle d'activateur de l'expression du gène.

A l'inverse, en présence d'un inhibiteur approprié, la modification post-traductionnelle ne se produira pas, et la protéine de fusion inductrice ne sera plus adressée à la membrane et pourra donc jouer son rôle d'activateur de l'expression du gène.

L'invention a pour objet une protéine de fusion inductrice de l'expression d'un gène comprenant, d'une part, un domaine peptidique de liaison aux acides nucléiques et un domaine activateur de l'expression dudit gène, et, d'autre part, un domaine permettant une délocalisation à la membrane cytoplasmique.

A titre d'exemple de protéine de fusion inductrice selon l'invention, on citera les protéines de fusion R17-4G-CVLS où CVLS correspond à un domaine "CAAX" décrit comme responsable de la délocalisation de la protéine à la membrane.

L'invention a également pour objet un acide nucléique comprenant une séquence codant pour la

protéine de fusion inductrice de l'expression selon l'invention. Cet acide nucléique peut être un ADN double brin ou monobrin, un ADNc, un ARNm.

L'invention a également pour objet un vecteur
5 d'expression, en particulier un plasmide, comprenant un acide nucléique selon l'invention.

L'invention a également pour objet une cellule recombinée comprenant un acide nucléique selon l'invention intégré dans son génôme, ainsi qu'une
10 lignée cellulaire comprenant un tel acide nucléique. On citera à titre d'exemples non limitatifs les cellules d'hépatome humaines SKHep-1 ou les cellules HeLa.

L'invention a également pour objet un organisme non humain transgénique, par exemple une souris,
15 comprenant en tant que transgène un acide nucléique selon l'invention.

Plus précisément, selon l'invention, le procédé de contrôle externe, permanent et modulable de l'induction de l'expression d'un gène d'une cellule
20 recombinée ou d'un organisme non humain transgénique comprenant un acide nucléique comprenant une séquence codant pour une protéine de fusion inductrice selon l'invention, ou comprenant un vecteur comprenant ledit acide nucléique, implique la modulation de l'état de
25 modification post-traductionnelle de la protéine de fusion induisant l'expression du gène par l'utilisation d'un inhibiteur approprié de la modification post-traductionnelle de ladite protéine de fusion.

Le contrôle de l'induction de l'expression du
30 gène est donc simple, modulable et permanent : il est possible à tout moment de commencer, arrêter, reprendre l'addition de l'inhibiteur de la modification post-

traductionnelle approprié, de modifier les quantités ajoutées, afin de contrôler l'induction aussi bien qualitativement que quantitativement.

De nombreuses applications de l'invention peuvent
5 être envisagées.

En particulier, l'invention présente un grand intérêt en thérapie génique. Il est possible de compléter le génôme défectueux d'un organisme avec un gène x dont l'expression sera contrôlée de façon
10 précise à l'aide de concentrations modulables de l'inhibiteur approprié. Il est également possible de faire exprimer en concentration variable et contrôlée un ou des gènes capables de tuer ou d'inhiber la prolifération des cellules de l'organisme (par exemple
15 gène codant pour la fraction soluble de récepteur membranaire, gène codant pour fragments scFv d'anticorps etc...). Il est aussi possible de contrôler l'expression et donc de faire exprimer en concentration variable des antioncogènes (par exemple p53, p70), des
20 cytokines ou interleukines, des facteurs de croissance, des dominants négatifs de certaines protéines, des xénogènes.

L'invention peut également être utilisée pour le criblage d'inhibiteurs de modification post-
25 traductionnelle. Ce criblage peut être effectué grâce à un kit de criblage : kit obtenu par intégration stable de plasmides selon l'invention dans des lignées cellulaires, ou kit obtenu par transfection provisoire ou « plasmides nus ». Un kit selon l'invention permet
30 d'évaluer l'influence de la présence d'un agent donné sur la modification post-traductionnelle d'une protéine de fusion inductrice, et permet donc de déterminer si

ledit agent est ou non un inhibiteur. A titre d'exemples d'inhibiteurs criblés, on peut citer les inhibiteurs de prényl transférase antifarnésyl, les inhibiteurs de prényl transférase antigéranyl-géranyl, les inhibiteurs de palmitoylation, les inhibiteurs de myristylation, etc.

L'invention peut également être utilisée en recherche fondamentale pour sélectionner l'expression de certains gènes dans des cellules en culture ou dans des tissus d'animaux de laboratoire (in vitro). On peut générer l'induction et la modulation ponctuelle ou à long terme de l'expression de n'importe quelle protéine ; on peut obtenir une induction et une répression rapides de l'expression de protéine.

On pourra notamment utiliser des agents déjà connus et en phase clinique pour d'autres applications (en particulier des inhibiteurs) et dont on sait qu'ils n'ont pas d'effets toxiques.

Exemple 1

Cet exemple a pour objet la mise en évidence du contrôle de l'induction de l'expression d'un gène dans des cellules mammifères en culture ex vivo.

Dans cet exemple, l'étape de l'expression qui est induite est la traduction, et la modification post-traductionnelle de la protéine de fusion inductrice est une farnésylation.

On utilisera des plasmides de deux types :

1. des plasmides "reporteurs" permettant de transcrire dans les cellules un ARN bicistronique codant pour les protéines reportrices LucR (Luciférase renilia) en premier cistron et LucF (Luciférase

firefly) en deuxième cistron. Les plasmides pCRL30-R17 ou pCRL138-R17 contiennent en outre dans l'espace intercistronique de l'ARNm un site de liaison pour la protéine de capsid du bactériophage R17 (plasmide).

5 Les plasmides pCRL30 ou pCRL138 (contrôle) ne contiennent pas ce site.

2. des plasmides effecteurs qui vont pouvoir exprimer dans les cellules :

- 10 - une protéine de fusion entre la protéine de capsid de phage R17 et la région C-terminale du facteur d'initiation de la traduction eIF4G, pour le plasmide pCI R17-4G,
- 15 - une protéine de fusion entre la protéine de capsid de phage R17, la région C-terminale du facteur d'initiation de la traduction eIF4G et un domaine protéique de farnésylation (de séquence protéique CVLS), pour le plasmide pCI R17-4G-CVLS.

20

On procède de la façon suivante. Des cellules d'hépatome humaines SKHep-1 sont transfectées transitoirement à l'aide de liposomes cationiques en utilisant 10 pmoles de plasmides reporteurs et 5 pmoles
25 de plasmides activateurs pour 1 million de cellules. 24 heures après la transfection, les cellules sont traitées durant différentes périodes (1 à 8 heures) par un inhibiteur de farnésyl transférase, le Cys-Val-3(2-Naphthyl)Ala-Met ; Sigma C4433, à une concentration
30 finale de 15 μ M dans le milieu de culture.

Après lyse des cellules, les activités LucR et LucF sont dosées à l'aide du kit « Dual-Luciferase (TM)

Reporter System » (Promega E1980) sur un appareil à
luminescence de type Berthold LB96B. Le rapport
LucF/LucR représente l'activité de traduction du
deuxième cistron qui est sous contrôle du système
5 d'inductibilité.

Les graphes de la figure 1 représentent
l'évolution du rapport LucF/LucR en fonction du temps
de traitement pour les deux types de plasmide reporteur
pCRL30 et pCRL30-R17. Le graphe a montre l'évolution du
10 rapport en absence de plasmide effecteur. Le graphe b
montre l'évolution du rapport en présence de plasmide
exprimant la protéine de fusion R17-4G. Le graphe c
montre l'évolution du rapport en présence de plasmide
exprimant la protéine de fusion inductrice R17-4G-CVLS.

15 On peut observer que le rapport est faible dans
le cas où les plasmides reporteurs sont transfectés en
l'absence de plasmides effecteurs. La traduction du
deuxième cistron est donc faible dans ce cas (graphe
a). L'expression de la protéine de fusion R17-4G permet
20 une augmentation du niveau de traduction du deuxième
cistron de l'ARN bicistronique reporteur contenant le
site R17 (pCRL 30R17), mais pas de celui ne contenant
pas le site R17 (pCRL 30) (graphe b). On peut observer
enfin (graphe c) que le niveau de traduction induite
25 par l'expression de la protéine de fusion R17-4G n'est
pas modulé par le traitement avec l'inhibiteur de
farnésyl transférase. Au contraire, l'augmentation de
traduction induite par la protéine de fusion inductrice
R17-4G-CAAX est modulée par l'utilisation de
30 l'inhibiteur de farnésyl transférase, et plus
particulièrement est dépendante du temps de traitement
par l'inhibiteur de farnésyl transférase.

Exemple 2

Les travaux réalisés sur les SKHep peuvent être étendus à d'autres lignées cellulaires et notamment les
5 cellules HeLa (issue d'un adénocarcinome utérin).

Cette lignée HeLa a été utilisée pour réaliser des intégrations permanentes de plasmides effecteurs exprimant la protéine de fusion R17-4G-CVLS ou de plasmides "reporteurs" contenant (pCRL30-R17 ou
10 pCRL138-R17) ou non (pCRL30 ou pCRL138) la structure ARN reconnue par la protéine R17. Ces transfections permanentes associées à un gène de résistance au G418 ont permis la sélection de clones cellulaires. Parmi les clones obtenus, ceux qui permettaient d'avoir le
15 meilleur signal d'activation par rapport au bruit de fond ont été sélectionnés.

Deux types d'études ont été réalisés en fonction du clone stable utilisé.

20 Première étude.

a) Confirmation de l'effet de l'inhibiteur de farnésyl transférase FTI 277.

L'acide nucléique codant pour la protéine R17-4G-CVLS est intégré dans le génome de cellules HeLa. On
25 réalise des transfections transitoires des plasmides reporteurs pCRL138 et pCRL138-R17 dans ce clone. On recherche ensuite les produits agissant sur la farnésylation de R17-4G-CVLS.

30 La figure 2A confirme l'effet de l'inhibiteur de farnésyl transférase FTI 277.

Le DMSO est le solvant dans lequel sont dissous les produits (FTI 277 et GGTI 298) ajoutés dans le milieu de culture, et représente donc un contrôle de l'induction. La concentration finale en DMSO dans le milieu de culture ne dépasse pas 0,1%.

Les rectangles blancs représentent l'ARN qui porte la séquence de reconnaissance de la protéine R17. Les rectangles noirs représentent les activités obtenues dans les mêmes conditions avec une séquence d'ARN semblable mais ne portant plus la reconnaissance R17, il s'agit donc du témoin négatif de la première construction.

L'induction est représentée par le quotient des valeurs LucF et LucR mesurées directement en présence d'un agent (FTI 277 ou GGTI 298), par rapport au contrôle DMSO.

Ainsi, la cinétique d'action de FTI 277 représentée en figure 2A montre que FTI 277 a un effet inducteur, et que l'effet d'activation maximal est obtenu à 8 heures de traitement. Il faut également noter que le traitement des cellules par un inhibiteur de géranylgéranyl transférase, le GGTI 298, n'a pas d'effet d'activation, ce qui démontre la spécificité du mécanisme.

La figure 2B montre que l'effet d'activation du FTI 277 est réversible. Dans cette expérience, on a traité les cellules pendant 8 h avec du FTI 277 1 μ M puis on a enlevé le produit et on a observé une diminution rapide du rapport d'activation LucF/LucR aux différents temps indiqués.

b) Confirmation de l'effet de l'inhibiteur de l'HMGCoA-réductase et criblage d'inhibiteurs

L'HMGCoA-réductase, qui synthétise le mévalonate, est impliquée dans l'isoprénylation, une modification post-traductionnelle des protéines telles que 4G-CVLS.

Cette enzyme est inhibée par les statines (lovastatine, simvastatine etc...).

Dans la figure 3, les cellules utilisées au cours de ces essais sont des HeLa transfectées de manière stable par le plasmide codant pour la protéine de fusion R17-4G-CVLS, et transfectées transitoirement par les plasmides reporteurs bicistroniques *pCRL138* et *pCRL138-R17*.

Les résultats sont présentés sous forme de rapport d'activité LucF/LucR en présence de différents agents pharmacologiques dans le milieu de culture, par rapport à un témoin DMSO.

On voit en pistes 3 et 6 de la figure 3 que la présence de statine inhibe l'HMGCoA-réductase, donc la présylation, la protéine de fusion n'est donc pas adressée à la membrane et joue son rôle d'activateur.

On voit en pistes 2, 4 et 5 que la présence de mévalonate, synthétisé par l'HMGCoA-réductase, permet, même en présence d'un inhibiteur de l'HMGCoA-réductase, l'isoprénylation c'est-à-dire la modification post-traductionnelle de la protéine de fusion qui sera donc adressée à la membrane et qui ne pourra jouer un rôle d'activateur d'où des rapports LucF/LucR identiques ou très proches de celui du témoin.

Le modèle utilisé a également permis de cribler des agents inhibiteurs potentiels de l'HMGCoA-réductase.

On voit en pistes 7 et 8 que le tamoxifène, un anti-œstrogène, inhibe cette enzyme même à de faibles concentrations. Cette activité inhibitrice est indépendante de l'œstradiol et du récepteur des oestrogènes (absent dans les cellules HeLa utilisées) et est inversée ou compensée par le mévalonate (piste 9).

D'autres anti-oestrogènes ont été testés.

En pistes 13, 14 et 15 sont représentés les résultats obtenus avec des anti-oestrogènes stéroïdiens des sociétés ICI et Roussel Uclaf, ayant une forte affinité pour le récepteur des oestrogènes, à différentes concentrations. Ces anti-oestrogènes n'ont pas d'activité inhibitrice de l'HMGCoA-réductase.

Par contre un autre anti-œstrogène, appelé PBPE, conçu et fabriqué par les inventeurs, ne se liant pas au récepteur des oestrogènes mais se liant à un complexe protéique dit AEBS (« antiestrogen binding site ») s'est révélé être inhibiteur de l'HMGCoA-réductase (pistes 10 et 11), son activité inhibitrice étant, comme pour les inhibiteurs précédents, compensée par la présence de mévalonate.

c) Molécules inhibitrices de la farnésyl pyrophosphate-synthase également appelée FPP-synthase.

Cette enzyme est nécessaire à la biosynthèse des farnésylpyrophosphates. Son inhibition inhibe donc également la prénylation des protéines.

Dans ces essais représentés dans la figure 4, le même modèle cellulaire qu'en b), transfecté de manière stable avec R17-4G-CVLS, est utilisé.

Les résultats des pistes 2 à 6 et 9 montrent que les biphosphonates, habituellement utilisés comme antalgiques dans le traitement des métastases osseuses, sont également des inhibiteurs de la farnésylation et que leur présence augmente donc le rapport LucF/LucR.

Les résultats des pistes 7 et 8 montrent que la présence de mévalonate ne compense pas l'activité inhibitrice des biphosphonates. Au contraire, la présence de farnésol (pistes 11 et 12) inverse ou compense l'activité inhibitrice des biphosphonates, ce qui montre que cette activité n'est pas liée à l'inhibition de la 1'HMGCoA-réductase, mais qu'ils agissent en aval dans la cascade de biosynthèse des isoprènes et sans doute au niveau de la FPP-synthase.

Les résultats obtenus en présence de tamoxifène (pistes 12 à 16) montrent que le tamoxifène est également un inhibiteur de la FPP-synthase.

Ce modèle a donc permis de montrer que certaines molécules inhibent de façon inattendue la biosynthèse des isoprényles en agissant sur la prénylation protéique. Il a mis en évidence que deux familles de médicaments (antiestrogènes et biphosphonates) parmi les plus utilisés en cancérothérapie du fait de leur grande innocuité, sont également capables d'inhiber la farnésylation.

Deuxième étude.

Les séquences reportrices pCRL138 ou pCRL138-R17 sont intégrées dans le génome des cellules HeLa, et différentes constructions R17-4G-CAAX - où CAAX peut être farnésylé "CVLS", ou géranylgéranylé "CVLL", ou ne

pouvant plus subir de modifications post-traductionnelles de ce type "SVLS" - sont transfectées de manière transitoire dans ces deux clones.

Après transfection, les cellules sont traitées
5 par du FTI 277 (inhibiteur de farnésyl transférase) ou du GGTI 298 (inhibiteur de géranyl transférase).

On observe les résultats suivants, représentés en figure 5, par rapport aux témoins DMSO :

- 10 - pour R17-4G-CVLS (qui contient une boîte de farnésylation), seul le FTI 277 est capable d'activer la traduction,
- pour R17-4G-CVLL (qui contient une boîte de géranylation), seul le GGTI 298 est capable d'activer la traduction,
- 15 - pour R17-4G-SVLS (qui ne peut être ni farnésylé, ni géranylé), aucune des deux molécules n'est capable d'activation.

Cette expérience montre donc une très bonne
spécificité d'action des inhibiteurs, ce qui permet un
20 contrôle précis de l'induction.

Par ailleurs, la localisation subcellulaire de protéines contenant les boîtes CVLS, CVLL ou SVLS a été contrôlée.

25 Pour ce faire, ces boîtes ont été mises en fusion avec la protéine YFP (« yellow Fluorescent protein »), et toutes les protéines de fusion ont été clonées avec une séquence HA en N-terminal. Les constructions ont été transfectées de façon transitoire dans des cellules
30 HeLa, et la localisation des protéines de fusion a été suivie en microscopie à fluorescence après

immunofluorescence avec un anticorps anti-HA (Fig. 6A et B, en couleur).

On remarque que les protéines de fusion contenant des boîtes CVLS ou CVLL sont à localisation membranaire
5 prédominante.

On peut également noter que le traitement par le FTI 277 (8 heures) relocalise uniquement les protéines YFP-CVLS et R17-4G-CVLS vers le cytoplasme, ce qui n'est pas le cas du traitement par le GGTI 298.

REVENDICATIONS

1. Protéine de fusion inductrice de l'expression
5 d'un gène caractérisé en ce qu'elle comprend, d'une
part, un domaine peptidique de liaison aux acides
nucléiques et un domaine activateur de l'expression du
gène, et, d'autre part, un domaine permettant une
délocalisation à la membrane cytoplasmique.
 - 10 2. Protéine de fusion selon la revendication 1,
caractérisée en ce que le domaine activateur de
l'expression est un domaine activateur de la
traduction.
 - 15 3. Protéine de fusion selon l'une ou l'autre des
revendications 1 et 2, caractérisée en ce que le
domaine permettant une délocalisation à la membrane
cytoplasmique est un domaine de farnésylation.
 - 20 4. Acide nucléique comprenant une séquence codant
pour une protéine selon l'une quelconque des
revendications 1 à 3.
 5. Vecteur d'expression comprenant un acide
nucléique selon la revendication 4.
 - 25 6. Cellule recombinée comprenant un acide
nucléique selon la revendication 4 ou un vecteur
d'expression selon la revendication 5.
-
-

REVENDICATIONS

1. Protéine de fusion inductrice de l'expression d'un gène caractérisé en ce qu'elle comprend, d'une part, un domaine peptidique de liaison aux acides nucléiques et un domaine activateur de l'expression du gène, et, d'autre part, un domaine permettant une délocalisation à la membrane cytoplasmique.

2. Protéine de fusion selon la revendication 1, caractérisée en ce que le domaine activateur de l'expression est un domaine activateur de la traduction.

3. Protéine de fusion selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que le domaine permettant une délocalisation à la membrane cytoplasmique est un domaine de farnésylation.

4. Acide nucléique comprenant une séquence codant pour une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5. Vecteur d'expression comprenant un acide nucléique selon la revendication 4.

6. Cellule recombinée comprenant un acide nucléique selon la revendication 4 ou un vecteur d'expression selon la revendication 5.

7. Lignée cellulaire de cellules recombinées comprenant un acide nucléique selon la revendication 4 ou un vecteur d'expression selon la revendication 5, notamment lignée cellulaire SKHep et HeLa.

7. Lignée cellulaire de cellules recombinées comprenant un acide nucléique selon la revendication 4 ou un vecteur d'expression selon la revendication 5, notamment lignée cellulaire SKHep et HeLa.

5 8. Organisme non humain transgénique comprenant un acide nucléique selon la revendication 4 ou un plasmide selon la revendication 5.

10 9. Procédé de contrôle externe, permanent et modulable de l'induction de l'expression d'un gène d'une cellule recombinée ou d'un tissu ou organisme non humain transgénique comprenant un acide nucléique comprenant une séquence codant pour une protéine de fusion selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou comprenant un vecteur d'expression comprenant ledit
15 acide nucléique, par modulation de l'état de modification post-traductionnelle de la protéine de fusion par l'utilisation d'un inhibiteur approprié de ladite modification post-traductionnelle.

20 10. Kit de criblage d'agents comprenant au moins une cellule selon l'une ou l'autre des revendications 6 et 7.

8. Organisme non humain transgénique comprenant un acide nucléique selon la revendication 4 ou un plasmide selon la revendication 5.

5 9. Procédé in vitro de contrôle externe, permanent et modulable de l'induction de l'expression d'un gène d'une cellule recombinée ou d'un tissu non
humain transgénique comprenant un acide nucléique comprenant une séquence codant pour une protéine de
fusion selon l'une quelconque des revendications 1 à 3,
10 ou comprenant un vecteur d'expression comprenant ledit acide nucléique, par modulation de l'état de modification post-traductionnelle de la protéine de fusion par l'utilisation d'un inhibiteur approprié de ladite modification post-traductionnelle.

15 10. Kit de criblage d'agents comprenant au moins une cellule selon l'une ou l'autre des revendications 6 et 7.

FIGURE 1

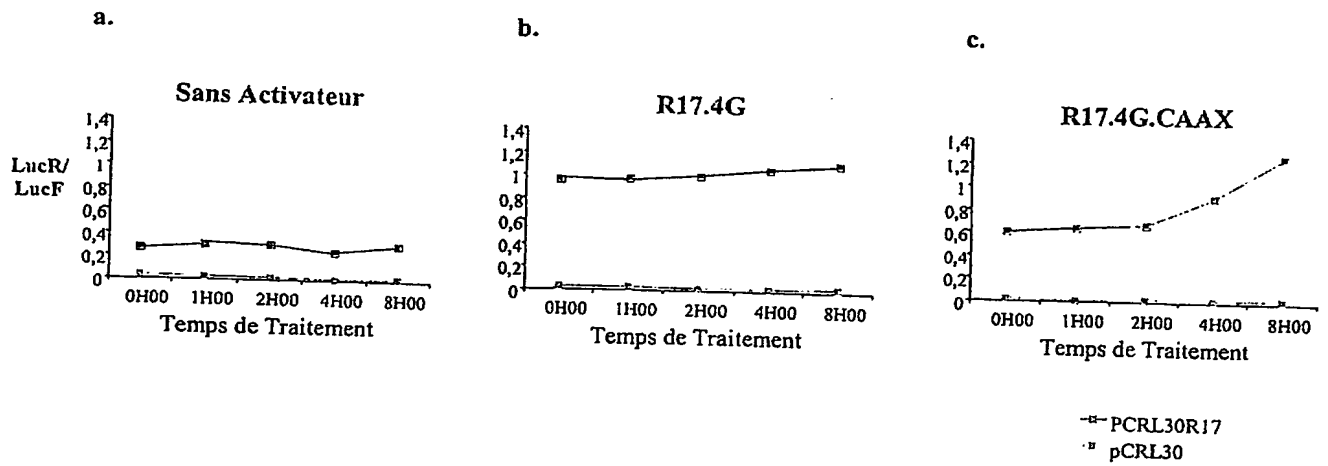


FIGURE 2

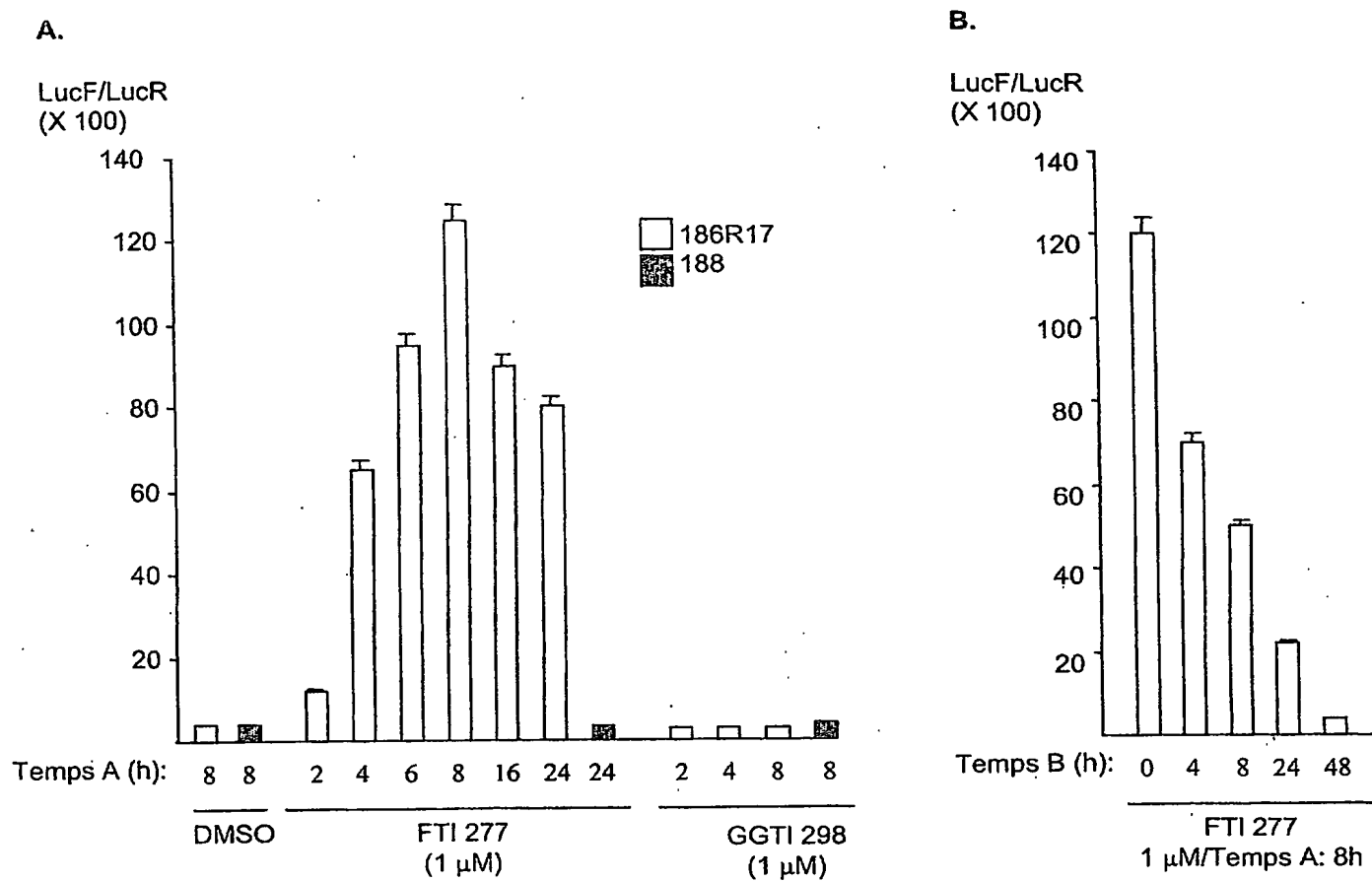
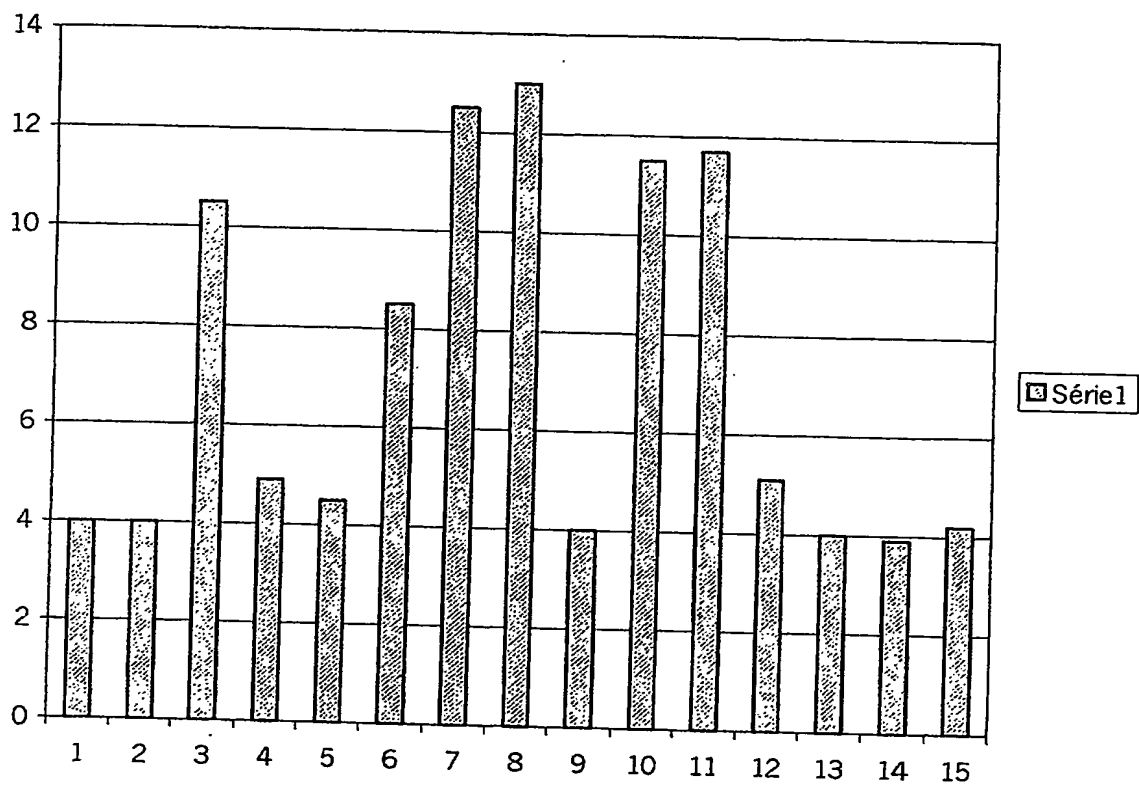


FIGURE 3



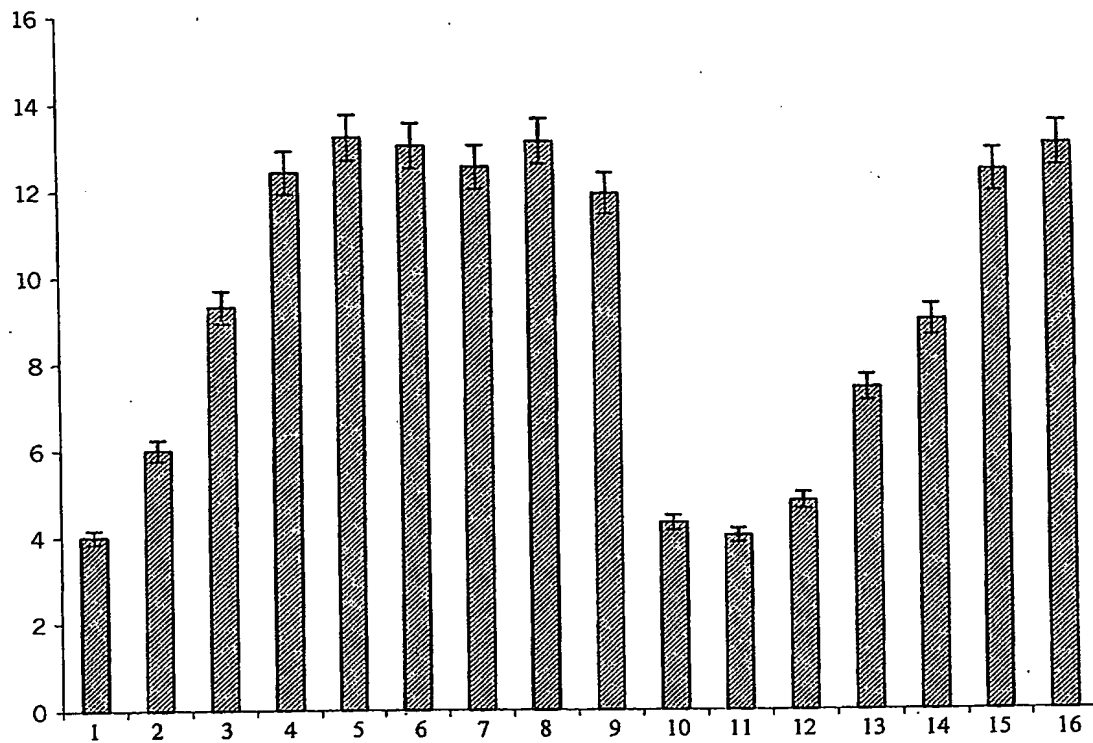
- 1 témoin
- 2 mev 1mM
- 3 stat 20µM
- 4 stat 20µM +mev 1mM
- 5 stat 5µM+mev 1mM
- 6 statine 5µM
- 7 tam 0,5µM
- 8 tam 0,5µM + œstradiol 100 nM
- 9 tamoxifène 0,5µM +mev 1mM
- 10 PBPE 5µM
- 11 PBPE 5µM +œstradiol 100nM
- 12 PBPE 5µM + mev 1mM
- 13 anti-stéroïdien 1µM
- 14 anti-stéroïdien 10µM
- 15 anti-stéroïdien 50µM

mev = mévalonate
stat = statine
tam = tamoxifène

FIGURE 4

Clone Stable 138R17 4G-CVLs Transitoire

LucF/LucR



Histogramme de l'activité (dose réponse) d'un biphosphonate et du tamoxifène

- 1 Clone témoin avec 4G-CVLS transitoire
- 2 + biphosphonate 0,1 μ M
- 3 + biphosphonate 0,5 μ M
- 4 + biphosphonate 1 μ M
- 5 + biphosphonate 5 μ M
- 6 + biphosphonate 10 μ M
- 7 + biphosphonate 1 μ M + mévalonate (mévalolactone) 50 μ M
- 8 + biphosphonate 1 μ M + mévalonate (mévalolactone) 250 μ M
- 9 + biphosphonate 5 μ M
- 10 + biphosphonate 1 μ M + farnésol 5 μ M
- 11 + biphosphonate 1 μ M + farnésol 10 μ M
- 12 + tamoxifène 0,01 μ M
- 13 + tamoxifène 0,05 μ M
- 14 + tamoxifène 0,1 μ M
- 15 + tamoxifène 0,5 μ M
- 16 + tamoxifène 1 μ M

FIGURE 5

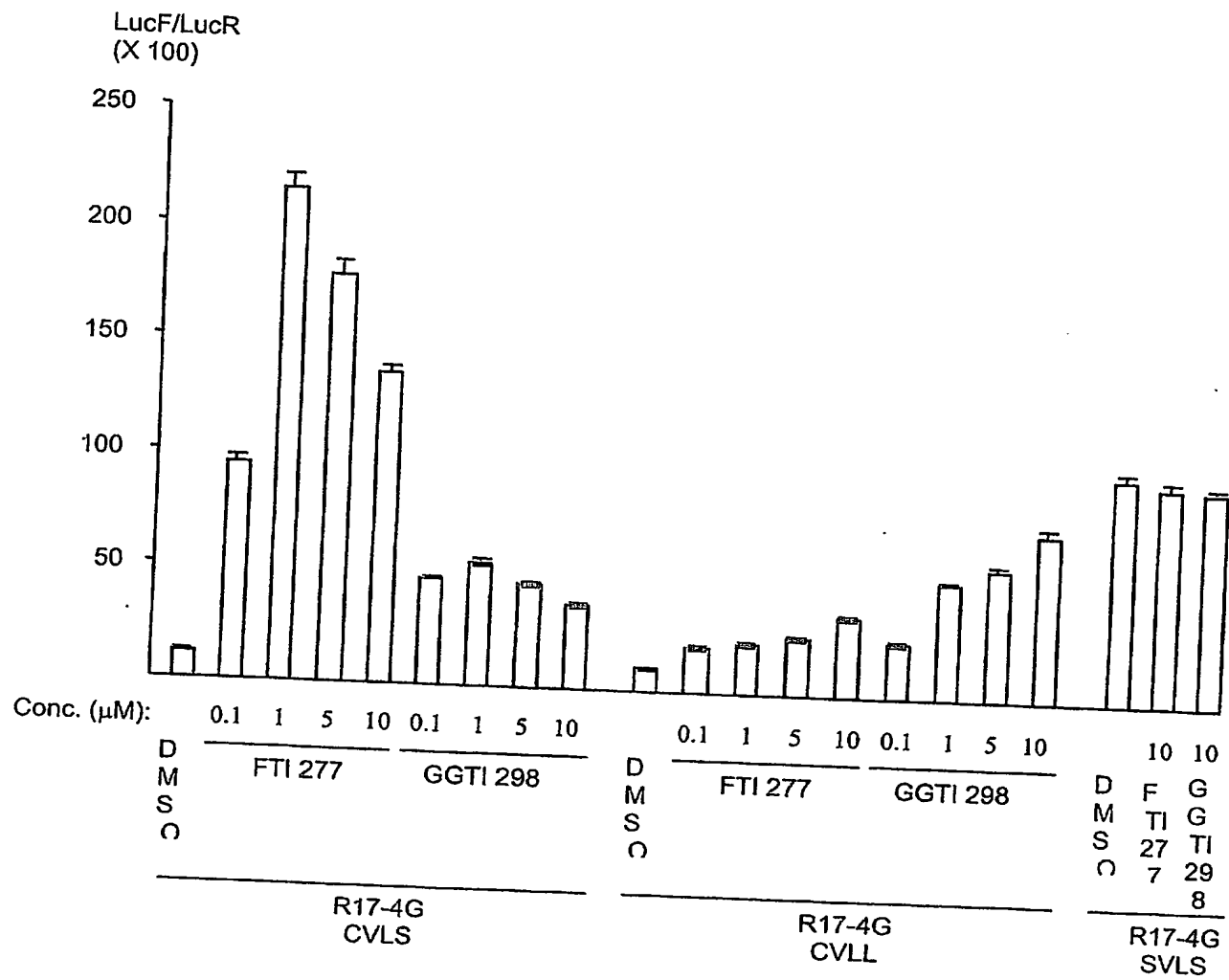
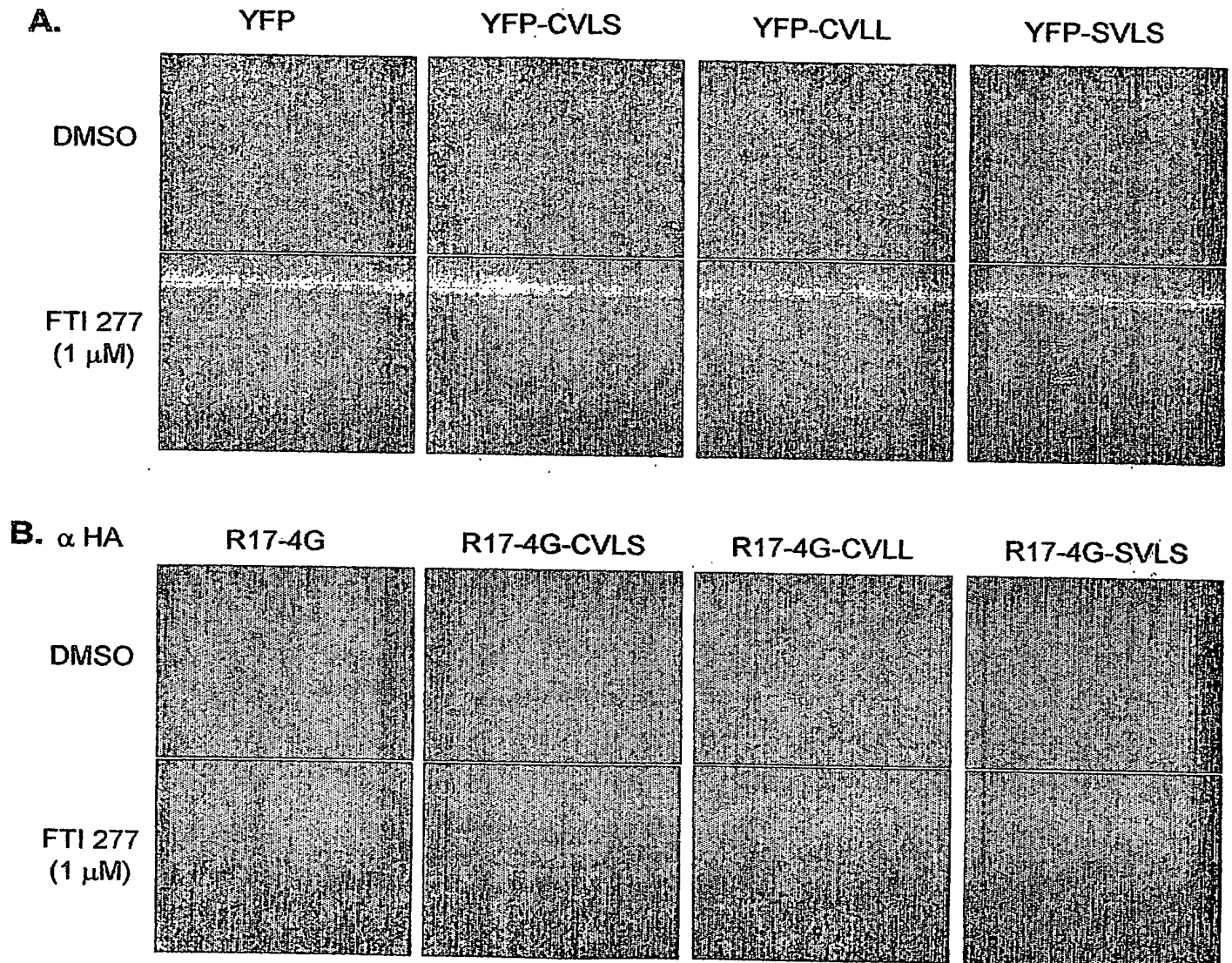


FIGURE 6



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

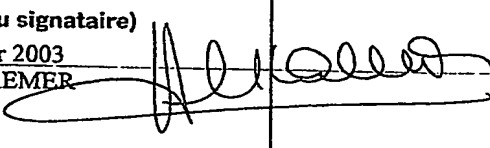
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .1. / .2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		LV/LN - BFF010330	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0300422	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
PROTEINE DE FUSION INDUCTRICE DE L'EXPRESSION D'UN GENE ET PROCEDE DE CONTROLE DE L'INDUCTION DE L'EXPRESSION D'UN GENE			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
MILLEGEN INSERM UNIVERSITE PAUL SABATIER			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		BOUTONNET	
Prénoms		Christel	
Adresse	Rue	2 rue de la Piscine	
	Code postal et ville	81000	ALBI
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		VAGNER	
Prénoms		Stephan	
Adresse	Rue	Lieu-dit Les Tailladettes	
	Code postal et ville	31810	CLERMONT LE FORT
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		FAYE	
Prénoms		Jean-Charles	
Adresse	Rue	La Merre	
	Code postal et ville	31310	MONTESQUIEU VOLVESTRE
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
Paris, le 15 janvier 2003 Laurence VERCAEMER CPI 00-0410			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

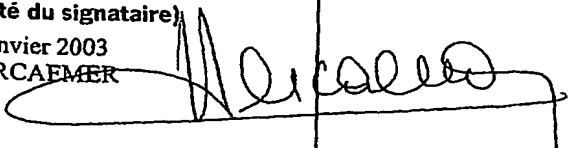
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .2. / .2.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		LV/LN - BFF010330	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0300422	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
PROTEINE DE FUSION INDUCTRICE DE L'EXPRESSION D'UN GENE ET PROCEDE DE CONTROLE DE L'INDUCTION DE L'EXPRESSION D'UN GENE			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
MILLEGEN INSERM UNIVERSITE PAUL SABATIER			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		FAVRE	
Prénoms		Gilles	
Adresse	Rue	61bis Chemin de Villenouvelle	
	Code postal et ville	31270	CUGNAUX
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		KHARRAT	
Prénoms		Abdelhakim	
Adresse	Rue	69 chemin Al Cers	
	Code postal et ville	31450	MONTGISCARD
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BOUAYADI	
Prénoms		Khalil	
Adresse	Rue	10 allées Philippe Aries	
	Code postal et ville	31400	TOULOUSE
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
Paris, le 15 janvier 2003 Laurence VERCAEMER CPI 00-0410			

PCT/FR2004/000073

